วานิลลา: ศักยภาพการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Vanilla: The Potential of Micro-propagation

ศักดินันท์ จันทคณานุรักษ์ และ กาญจนา รุ่งรัชกานนท์*

ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

*Email: kanjana.r@ubu.ac.th

บทคัดย่อ

วานิลลาเป็นกล้วยไม้ที่ฝักหรือผลเป็นสารแต่งกลิ่นในอาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอางและน้ำหอม สายพันธุ์ที่นิยมปลูกเพื่อใช้ผลิตฝักวานิลลาในทางการค้า คือ *Vanilla planifolia* โดยทั่วไปการขยายพันธุ์วานิลลาทำโดยการปักชำกิ่งที่ได้จากเถาแก่ แต่อย่างไรก็ตามการขยายพันธุ์จากกิ่งชำได้จำนวนน้อยใช้ระยะเวลาการขยายพันธุ์นาน และปัญหาที่สำคัญคือ ความเสี่ยงที่กิ่งชำจะมีการปนเปื้อนเชื้อโรค เช่น ไวรัส เชื้อรา และแบคทีเรีย บทความนี้จึงได้เรียบเรียงเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวานิลลาเพื่อเป็นทางเลือกในการเพิ่มจำนวนต้นวานิลลาที่ปลอดโรคอย่างมีศักยภาพ การเพิ่มจำนวนต้นวานิลลาโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีอยู่สองแนวทาง คือ การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ และการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญ ซึ่งการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อควรใช้ฝักที่มีอายุ 6 - 7 เดือน โดยมีเทคนิคที่สำคัญ คือ การล้างไขมันที่เคลือบเมล็ดออกด้วยเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นำเมล็ดไปเพาะในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมกรดอะมิโน tryptone และสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในกลุ่มไซโตไคนิน เช่น BAP และ kinetin อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเมล็ด คือ 32°ซ ในที่มืด ส่วนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญ มี 3 ขั้นตอน คือ การชักนำชิ้นส่วนให้เกิดยอดใหม่ การเพิ่มจำนวนยอด และการพัฒนายอดให้เป็นต้นอ่อน โดยนำชิ้นส่วนปลายยอด ข้อ และตาข้าง มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีการเติมสารในกลุ่มไซโตไคนิน เช่น BAP kinetin zeatin และ TDZ หรือสารตั้งต้นของไซโตไคนิน เช่น adenine sulfate หรือสารอินทรีย์ที่ได้จากพืช เช่น น้ำมะพร้าว สารเหล่านี้จะส่งเสริมให้ชิ้นส่วนมีการแบ่งเซลล์ ชักนำให้เกิดยอดใหม่และเพิ่มจำนวนยอดให้มากขึ้น ยอดวานิลลาที่เกิดขึ้นสามารถเกิดรากได้ง่ายในอาหารสังเคราะห์ที่มีหรือไม่มีการเติมสารในกลุ่มออกซิน ต้นอ่อนวานิลลามีอัตราการรอดชีวิต 85 - 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

คำสำคัญ : วานิลลา การขยายพันธุ์ การเพาะเมล็ด การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

คำย่อ : Murashige and Skoog (MS), 6-benzylaminopurine (BAP), Thidiazuron (TDZ)

Abstract

Vanilla is an orchid plant and the pod (fruit) is commercially used to make vanilla flavoring in foods, drinks, cosmetics, and perfume. The main species cultured for pod production is *Vanilla planifolia*. Vanilla is propagated by stem cutting from nature vines, but this method produces only limited cutting materials and takes a long time. Moreover, the process of stem cutting poses a high risk of infection from many pathogens, including viruses, fungi, and bacteria. This article describes tissue culture techniques as an alternative propagation method having potential to produce disease-free vanilla in quantity. There are two approaches in micro-propagation techniques; *in vitro* seed culture in which seeds should be taken from 6-7 month old pods and washed in 95% ethanol to eliminate lipid coated on the seed surface.

Seeds germination is done in Murashige and Skoog (MS) media supplemented with amino acid (tryptone) and cytokinin (BAP and kinetin) with a condition of 32°C in darkness: *in vitro* tissue culture includes 3 steps; the shoot induction, shoot proliferation, and plantlets formation. The explants (shoot tip, node, and axillary bud) are cultured in media supplemented with cytokinin (BAP, kinetin, zeatin, and TDZ), or cyotokinin precursor (adenine sulfate), or organic substances, such as coconut water. These substances promote cell division, induce new shoots, and enhance shoot proliferation. Each shoot is well rooted on medium with or without auxin. The survival rate of plantlets is 85-95 % after planting in natural conditions.

Key words: Vanilla; Propagation; Seed culture; Micro-propagation

บทนำ

วานิลลาเป็นพืชในวงศ์กล้วยไม้ที่ไม่ได้ถูกใช้ในการเป็นไม้ดอกไม้ประดับ แต่ถูกใช้ประโยชน์ในด้านสารให้กลิ่นหอมเพราะในฝักของวานิลลาที่ผ่านการหมักบ่มจะมีสาร Vanillin ที่มีกลิ่นหอม ถูกใช้แต่งกลิ่นในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอางและน้ำหอม [1] สายพันธุ์ที่นิยมปลูกเพื่อผลิตฝัก วานิลลาในทางการค้า คือ *Vanilla planifolia* มีการปลูกเป็นการค้าใน ตาฮิติ มาดากัสกา เปอโตริโก้ ฟิจิ สาธารณรัฐมาลากาซี อินโดนีเซีย โคโมรอส และยูกันดา [2], [3] ประเทศที่ส่งออกฝักวานิลลาที่ผ่านการหมักบ่ม ได้แก่ ซิซีลี รียูเนียน เม็กซิโก และโดมินิกา [3] ประเทศที่บริโภคฝักวานิลลามากที่สุด ได้แก่ สหรัฐอเมริกา และประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป [4] ยิ่งไปกว่านั้นฝักวานิลลายังเป็นเครื่องเทศที่มีราคาแพงเป็นอันดับที่สองรองจากหญ้าฝรั่น (saffron) [1], [4] โดยมีราคาอยู่ที่กิโลกรัมละ 3,000 บาทขึ้นไป [4] สำหรับการปลูกและผลิตฝักวานิลลาในประเทศไทยมีมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 มีแหล่งปลูกที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงต่างๆ เช่น ขุนวาง ป่าเมี่ยง ตีนตก ม่อนเงาะ และห้วยลึก เป็นต้น

วานิลลานิยมขยายพันธุ์ด้วยการปักชำกิ่งที่ได้จากเถาแก่ โดยการใช้กิ่งชำยาว 20 ซม. จะให้ผลผลิตหลังจากปลูกเพียง 3 – 4 ปี และการใช้กิ่งชำยาว 90 – 100 ซม. จะให้ผลผลิตหลังจากปลูกเพียง 1 – 2 ปี [5] แต่อย่างไรก็ตามการขยายพันธุ์จากกิ่งชำได้จำนวนน้อย ใช้ระยะเวลาการขยายพันธุ์นาน และปัญหาที่สำคัญคือ ความเสี่ยงที่กิ่งชำจะมีการปนเปื้อนเชื้อโรค เช่น ไวรัส ได้แก่ Cymbidium mosaic virus (CymMV) และ Vanilla mosaic virus โรคเน่าดำของยอดและฝักที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora* โรคเหี่ยวเหลืองจากเชื้อ *Fusarium* โรคเน่าจากเชื้อ *Sclerotium* และโรคแอนแทรคโนส [1], [4], [6], [7] การเพิ่มจำนวนต้นวานิลลาในสภาพปลอดเชื้อ จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการผลิตท่อนพันธุ์ บทความนี้จึงเรียบเรียงเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวานิลลา เพื่อเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์ทางการค้า

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้วานิลลาในสภาพปลอดเชื้อ

เมล็ดกล้วยไม้วานิลลาไม่สามารถที่จะงอกได้เองในสภาพธรรมชาติ [5] เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีเพียงคัพภะ (embryo) ไม่มีอาหารสะสม (endosperm) การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ในสภาพธรรมชาติต้องอาศัยเชื้อราบางชนิด เช่น ไมคอไรซ่า (mycorrhiza) ที่งอกเส้นใยเข้าไปในเมล็ด ซึ่งในเส้นใยของเชื้อรานี้จะมีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการงอกของเมล็ด เมล็ดจะย่อยสลายเส้นใยนำธาตุอาหารไปใช้ ทำให้เมล็ดงอกและเจริญเติบโตได้ การงอกประเภทนี้เรียกว่า “symbiosis germination” [8], [9] แต่อย่างไรก็ตามการงอกของเมล็ดกล้วยไม้โดยอาศัยเชื้อรามีเปอร์เซ็นต์การงอกที่น้อยมาก การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้อาหารสังเคราะห์ที่ประกอบไปด้วยแร่ธาตุหลายชนิด น้ำตาลและวุ้นโดยไม่อาศัยเชื้อรา เรียกการงอกประเภทนี้ว่า “asymbiosis germination” ทำให้เมล็ดมีการงอกที่ดีกว่า (รูปที่ 1)

และทำให้ได้ต้นกล้วยไม้จำนวนมาก [5], [9] ต้นกล้วยไม้วานิลลาที่ได้จากการเพาะเมล็ด มีความหลากหลายทางพันธุกรรม จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์วานิลลา [5]

ปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเพาะเมล็ดวานิลลาประกอบด้วย อายุฝัก อาหารสังเคราะห์ อุณหภูมิและแสง เมล็ดวานิลลามีสารประเภทไขมันเคลือบอยู่ และมีเปลือกหุ้มเมล็ดที่แข็ง [10] จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ขัดขวางไม่ให้น้ำหรือสารอาหารที่อยู่ในอาหารสังเคราะห์ผ่านเข้าไปในเมล็ดได้ ทำให้เมล็ดสามารถงอกในจำนวนน้อยหรือใช้ระยะเวลานาน (10 เดือน) การขจัดสารพวกไขมันที่เคลือบเมล็ดสามารถทำได้โดยการล้างเมล็ดในเอทานอล 95% ก่อนนำไปเพาะ [10] หรือการแช่เมล็ดวานิลลาในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถช่วยให้เมล็ดมีการงอกดีขึ้น [11]

อายุฝักของวานิลลาที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเมล็ด คือ ฝักอายุ 6 – 7 เดือนหลังการผสมเกสร [12], [13], [14], [15] อาหารสังเคราะห์ที่นิยมใช้ในการเพาะเมล็ดวานิลลา คือ อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and SKoog (MS) และอาหารสังเคราะห์สูตร Knudson B แต่อาหาร MS จะมีประสิทธิภาพมากกว่า [5] มีการวิจัยเพาะเมล็ดกล้วยไม้วานิลลาในอาหารที่มีองค์ประกอบต่างๆ พบว่าเมล็ดวานิลลามีเปอร์เซ็นต์การงอกที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช กรดอะมิโน และสารงต้นกรดอะมิโน เช่น tryptone มีผลต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้วานิลลา ในส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์ มีรายงานว่าสาร BAP สามารถส่งเสริมการงอกของเมล็ดและทำให้เมล็ดพัฒนาไปเป็นโปรโตคอร์มและต้นอ่อนโดยตรง [5] แต่ในอาหารที่เติม TDZ หรือในอาหารที่มีการเติม naphthalene acetic acid (NAA) มีผลทำให้เมล็ดที่มีการงอกจะมีการพัฒนาของโปรโตคอร์มไปเป็นแคลลัส [5], [15]

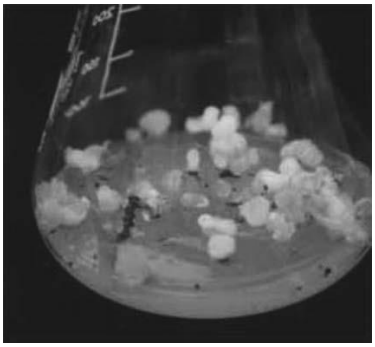
สภาพของอาหารก็มีผลต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้วานิลลา โดยการเพาะเมล็ดในอาหารเหลว MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. ร่วมกับ indole butyric acid (IBA) ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ในสภาพเขย่า 80 รอบต่อนาที สามารถทำให้เมล็ดมีการงอกได้ภายใน 45 วัน พัฒนาไปเป็นโปรโตคอร์มภายใน 60 วัน และพัฒนาเป็นต้นใช้เวลา 90 – 100 วัน [12] ซึ่งการเพาะเมล็ดกล้วยไม้วานิลลาในอาหารเหลวมีข้อดีคือ เมล็ดได้รับน้ำอย่างเพียงพอ และในสภาพเขย่าอาจจะช่วยขจัดไขมันที่เคลือบเมล็ดให้หลุดออกไป

อุณหภูมิมีผลต่อการงอกของเมล็ดวานิลลาในสภาพปลอดเชื้อ มีรายงานว่าเมล็ดวานิลลาสามารถงอกได้ในสภาพอุณหภูมิปกติที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ 25°C [13] และสภาพอุณหภูมิสูง 32 – 36°C ที่อุณหภูมิ 32 °C เมล็ดงอกได้ 17 – 49% [10], [11], [16]

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้วานิลลาในอาหารสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบต่างๆ

อาหารสังเคราะห์	เปอร์เซ็นต์การงอก	อ้างอิง
Knudson B	17 – 29	[10]
Knudson B เจือจาง 10 เท่า	49	[11]
MS + tryptone 2.0 $g.L^{-1}$	85	[12]
MS + NAA 4.0 $mg.L^{-1}$ + BAP 1.0 $mg.L^{-1}$ + tryptone 500 $mg.l^{-1}$	89	[13]
MS + kinetin 0.5 $mg.L^{-1}$	87	[14]
MS + BAP 0.5 $mg.L^{-1}$	49	[16]
MS + glutamine 400 $mg.L^{-1}$ + adenine sulfate 80 $mg.L^{-1}$	57.9 (*V. planifloria* x *V. pompona*) 85 (*V. pompona* x *V. planifloria*)	[17]

สภาพแสงมีผลต่อการงอกของเมล็ด การเพาะเมล็ดวานิลลาในที่มีแสงเมล็ดไม่สามารถงอกได้ [17] เมื่อเพาะเมล็ดและเมล็ดมีการงอกแล้วในที่มืด หลังจากนั้นจึงย้ายไปเลี้ยงในสภาพที่มีแสง [10], [11], [13] แสดงให้เห็นว่าความมืดมีความจำเป็นสำหรับการงอกของเมล็ดวานิลลา



รูปที่ 1. เมล็ดวานิลลาที่งอกในสภาพปลอดเชื้อ
ที่มา : Divakaran และคณะ (2010) [5]

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญ

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญเป็นวิธีการหนึ่งที่นำมาใช้ในการขยายพันธุ์กล้วยไม้วานิลลา นอกเหนือจากการใช้กิ่งชำและการเพาะเมล็ด เนื่องจากต้นที่ได้ปลอดเชื้อโรคทำให้เมื่อนำไปปลูกในแหล่งปลูกใหม่จะไม่เป็นแหล่งแพร่กระจายเชื้อโรคต่างๆ [1] และต้นวานิลลาที่ได้ยังมีความคงที่ทางพันธุกรรม [2], [4]

ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญของวานิลลาที่นิยมใช้ในการเพิ่มจำนวนต้นในสภาพปลอดเชื้อ คือ ปลายยอดและข้อ [1], [18], [19], [20], [21], [22] และตาข้าง [21], [23], [24] จำนวนของต้นใหม่ที่เกิดขึ้นจากชิ้นส่วนต่างๆ มีจำนวนแตกต่างกัน ส่วนอาหารสังเคราะห์ที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวานิลลา คือ อาหารสูตร MS ที่เติมไซโตไคนิน และออกซิน [2]

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวานิลลาจากชิ้นส่วนปลายยอดและข้อ

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดและข้อจะต้องผ่านกระบวนการสองขั้นตอน คือ 1) การชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดยอด ใหม่ และ 2) การเพิ่มจำนวนจากยอดที่เกิดใหม่ สูตรอาหารที่นิยมใช้ในการชักนำยอดและเพิ่มจำนวนยอด คือ อาหารกึ่งแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่มีน้ำตาลทราย 20 – 30 ก./ล. ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช สารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์

1.1 การชักนำให้เกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนปลายยอดและข้อ

ชิ้นส่วนปลายยอดและข้อของวานิลลาจะถูกนำมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารในกลุ่มไซโตไคนิน หรือเติมสารอื่นร่วมด้วย เช่น อาหารที่เติม BAP 0.5 มก./ล. [5], [19] BAP 1.0 มก./ล. [18] BAP 1.5 มก./ล. [22] BAP 1.0 มก./ล. ร่วมกับน้ำมะพร้าว 150 มล./ล. [20]

ชิ้นส่วนข้อเดี่ยวจะถูกนำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติม BAP 2.4 มก./ล. ร่วมกับ zeatin 1.0 มก./ล. [25] BAP 0.1 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2.15 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.2 มก./ล. [4] BAP 1.0 มก./ล. ร่วมกับ gibberellic acid (GA_3) 0.5 มก./ล. [1] TDZ 1.0 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 100 มล./ล. [25] นอกจากนี้ยังมีการใช้อาหารสังเคราะห์ที่มีการเติมกรดอะมิโนที่เป็นแหล่งของไนโตรเจน เช่น adenine sulfate ร่วมกับสารอื่นๆ ในการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดใหม่ เช่น การเลี้ยงชิ้นส่วนข้อในอาหารที่เติม adenine sulfate 160 มก./ล. ร่วมกับ L-cysteine 40 มก./ล., citric acid 150 มก./ล. และ ascorbic acid 150 มก./ล. [4]

อาหารที่ใช้เหล่านี้จะกระตุ้นตาที่อยู่ในภาวะพักตัวที่อยู่บริเวณปลายยอดและข้อของชิ้นส่วน ให้หยุดการพักตัวและกระตุ้นให้มีการเกิดยอดขึ้นมาจำนวนหนึ่ง (1 – 6 ยอด) ภายในระยะเวลา 8 – 45 วัน (รูปที่ 2a) ขึ้นกับอาหารสังเคราะห์ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2

1.2 การเพิ่มจำนวนยอดจากยอดที่เกิดใหม่

ยอดที่เกิดใหม่จากการชักนำจะถูกตัดแยกออกมาเป็นยอดเดี่ยวๆ หรือกลุ่มของยอดที่เกิดใหม่ หรือทำการตัดแยกข้อจากยอดใหม่ที่มีการเจริญและยืดตัว มาใช้เป็นชิ้นส่วนในการเพิ่มจำนวน โดยนำชิ้นส่วนมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรเดิมหรือสูตรใหม่ อาหารที่ใช้เพิ่มจำนวนยอด คือ อาหารสังเคราะห์

สูตร MS ที่เติมสารในกลุ่มไซโตไคนิน หรือเติมสารอื่นร่วมด้วย เช่น BAP 1.0 มก./ล. [18] BAP 1.0 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. [19] BAP 1.0 มก./ล. ร่วมกับน้ำมะพร้าว 150 มล./ล. [20] BAP 10 มก./ล. ร่วมกับ adenine sulfate 160 มก./ล., L-cysteine 40 มก./ล., citric acid 150 มก./ล. และ ascorbic acid 150 มก./ล. [4] BAP 1.0 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 1.5 มก./ล. [1] BAP 1.5 มก./ล. [22] BAP 2.0 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1.0 มก./ล. และ d-biotin 20 มก./ล. [25] ชิ้นส่วนที่นำมาเพิ่มจำนวนยอดจะมีการตอบสนองและมีการเกิดยอดขึ้นมา (4 – 30 ยอด/ชิ้นส่วน) โดยใช้ระยะเวลา 20 – 90 วัน (รูปที่ 2b) ดังแสดงในตารางที่ 2

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้วานิลลาจากชิ้นส่วนตาข้าง

ตาข้างของกล้วยไม้วานิลลาได้จากการตัดแยกข้อของต้นกล้วยไม้วานิลลาที่ปลูกอยู่ในโรงเรือน แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์เพื่อชักนำให้เกิดยอดใหม่และเพิ่มจำนวนยอด การเพิ่มจำนวนต้นกล้วยไม้วานิลลาจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างมีอยู่ 3 รูปแบบ ดังแสดงในตารางที่ 3

2.1 การชักนำให้เกิดยอดในอาหารเหลวและเพิ่มจำนวนในอาหารกึ่งแข็ง

ตาข้างจะถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม BAP 0.5 มก./ล. โดยเลี้ยงในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 ต่อนาที เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ก่อนนำชิ้นส่วนตาข้างไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งที่เติม BAP 1.0 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. ยอดเกิดขึ้นหลังจากการเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 สัปดาห์ จะเกิดยอดจำนวน 4.3 ยอดต่อชิ้นส่วน [23]

2.2 การชักนำให้เกิดยอดในอาหารกึ่งแข็งและเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว

นำตาข้างมาเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดยอดในอาหารกึ่งแข็งที่เติม BAP 2.0 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1.0 มก./ล. เป็นเวลา 90 วันหลังจากนั้นจึงทำการย้ายยอดที่เกิดใหม่ไปเพิ่มจำนวน ในอาหารเหลวที่เติม BAP 1.0 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล. ในสภาพเขย่า 90 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน และย้ายยอดไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง เป็นเวลา 30 วัน จะได้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน 42 ยอด ในระยะเวลารวม 135 วัน [24] หรือนำตาข้างมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งที่เติม BAP 2.15 มก./ล. แล้วย้ายยอดใหม่ที่เกิดขึ้นไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งที่เติม BAP 2.15 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.82 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน เพิ่มจำนวนยอดในอาหารเหลว ที่เติม BAP 2.15 มก./ล. ในสภาพเขย่า 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน ได้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน 18.6 ยอด ในระยะเวลารวม 90 วัน [21]

ตารางที่ 2 การชักนำและเพิ่มจำนวนยอดวานิลลาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ จากชิ้นส่วนปลายยอดและข้อ

อาหารสังเคราะห์สูตรชักนำ	อาหารสังเคราะห์สูตรเพิ่มปริมาณ	จำนวนยอดที่เพิ่มขึ้น	ระยะเวลาเพิ่มจำนวนยอด (วัน)	อ้างอิง
MS + BAP 1 mg.L^{-1}	MS + BAP 1 mg.L^{-1}	8 - 10	28	[18]
MS + BAP 0.5 mg.L^{-1}	MS + BAP 1 mg.L^{-1} + IBA 0.5 mg.L^{-1}	13.5	60	[5],[19]
MS + BAP 1 mg.L^{-1} + น้ำมะพร้าว 150 ml.L^{-1}	MS + BAP 1 mg.L^{-1} + น้ำมะพร้าว 150 ml.L^{-1}	9.4	20	[20]
MS + BAP 0.1 mg.L^{-1} + kinetin 2.15 mg.L^{-1} + NAA 0.2 mg.L^{-1} หรือ MS + adenine sulfate 160 mg.L^{-1} + L-cysteine 40 mg.L^{-1} + citric acid 150 mg.L^{-1} + ascorbic acid 150 mg.L^{-1}	MS + BAP 10 mg.L^{-1}+adenine sulfate 160 mg.L^{-1} + L-cysteine 40 mg.L^{-1} + citric acid 150 mg.L^{-1} + ascorbic acid 150 mg.L^{-1}	10.92	60 – 90	[4]
MS + BAP 1 mg.L^{-1} + GA_3 0.5 mg.L^{-1} (45 วัน)	MS + BAP 1 mg.L^{-1} + kinetin 1.5 mg.L^{-1}	4.17	45	[1]
MS + BAP 1.5 mg.L^{-1} (35 – 42 วัน)	MS + BAP 1.5 mg.L^{-1}	6.50	35 – 42	[22]
MS + zeatin 2 mg.L^{-1}	MS + d-biotin 20 mg.L^{-1} + BA 2 mg.L^{-1} + NAA 1 mg.L^{-1}	6.2	45	[25]

ตารางที่ 3 การชักนำและเพิ่มจำนวนยอดวานิลลาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ จากชิ้นส่วนตาข้าง

อาหารสังเคราะห์สูตรชักนำให้เกิดยอด	อาหารสังเคราะห์สูตรเพิ่มจำนวนยอด	ระยะเวลาการเพิ่มจำนวนยอดหลังจากการชักนำ	ยอดที่ได้ต่อชิ้นส่วน	อ้างอิง
อาหารเหลว MS + BAP 0.5 mg.L^{-1} 120 รอบต่อนาที (4 สัปดาห์)	อาหารกึ่งแข็ง MS + BAP 1 mg.L^{-1} + IBA 0.5 mg.L^{-1}	12 สัปดาห์ (เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 3 สัปดาห์)	4.3	[23]
อาหารกึ่งแข็ง MS + BAP 2 mg.L^{-1} + NAA 1 mg.L^{-1} (90 วัน)	อาหารเหลว MS + BAP 1 mg.L^{-1} + NAA 0.5 mg.L^{-1} 90 รอบต่อนาที และย้ายขึ้นอาหารกึ่งแข็ง	14 + 30 วัน	42	[24]
อาหารกึ่งแข็ง MS + BAP 2.15 mg.L^{-1} (30 – 45 วัน) ย้ายไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MS + BAP 2.15 mg.L^{-1}+ NAA 0.82 mg.L^{-1} (30 วัน)	อาหารเหลว MS + BAP 2.15 mg.L^{-1} 120 รอบต่อนาที	30 วัน	18.6	[21]
อาหารกึ่งแข็ง MS + BAP 3 mg.L^{-1}+ NAA 0.6 mg.L^{-1}	อาหารกึ่งแข็ง MS + BAP 3 mg.L^{-1} + NAA 0.6 mg.L^{-1}	10 เดือน (เปลี่ยนอาหารใหม่ทุกสัปดาห์)	14	[26]

2.3 การชักนำให้เกิดยอดและเพิ่มจำนวนในอาหารกึ่งแข็ง

นำตาข้างมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งที่เติม BAP 3.0 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.6 มก./ล. โดยทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 1 เดือน หลังจากนั้นจึงทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ สัปดาห์ หลังจากการเลี้ยงตาข้างในอาหารสังเคราะห์ 6 เดือน ตาข้างมีการเกิดตายอดเป็นจำนวนมาก และเมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนต่อไปจนครบ 10 เดือน พบว่าตายอดมีการเจริญและพัฒนาไปเป็นยอด มีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วน คือ 14 ยอดต่อชิ้นส่วนตาข้าง โดยยอดมีขนาดยาว 2.41 ซม. และมีใบ 3.2 ใบต่อยอด [26]

ในการเพิ่มจำนวนยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดข้อ และตาข้างของกล้วยไม้วานิลลา แสดงให้เห็นถึงความจำเป็นของฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนิน หรือสารที่ออกฤทธิ์คล้ายไซโตไคนินในการชักนำให้ชิ้นส่วนมีการเกิดยอดใหม่และเพิ่มจำนวนยอด ซึ่งยอดที่เกิดใหม่นั้นพัฒนามาจากตาที่อยู่บนชิ้นส่วนซึ่งเป็นจุดที่มีเนื้อเยื่อเจริญอยู่ [22] ในการชักนำและเพิ่มจำนวนยอดจะใช้ BAP, kinetin, zeatin หรือ TDZ เติมลงในอาหารสังเคราะห์เพื่อกระตุ้นเนื้อเยื่อเจริญมีการแบ่งเซลล์และมีการสร้างยอดใหม่ [4], [8], [19], [21], [25] ส่วนสารอื่นๆ เช่น ฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน คือ NAA หรือ IBA และฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน เช่น GA_3 ที่เติมลงในอาหารจะช่วยในการยืดยาวของเซลล์ในส่วนปล้องของยอด [1], [8], [19] และช่วยส่งเสริมกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์เพื่อเพิ่มจำวนยอด [19], [23] ทำให้ได้ยอดใหม่ไม่สั้นแคระเหมือนกับการใช้ฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนินเพียงชนิดเดียว [1] กรดอะมิโนบางชนิด เช่น adenine sulfate หรือสารอินทรีย์จากพืช เช่น น้ำมะพร้าว ซึ่งมี kinetin เป็นส่วนประกอบ มีผลช่วยส่งเสริมการออกฤทธิ์ของไซโตไคนินเมื่อมีการเติมลงในอาหาร [4], [8], [27] นอกจากนี้ adenine sulfate เมื่อทำการละลายลงในอาหารจะให้กรดอะมิโน adenine [8] ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไซโตไคนิน เช่น zeatin ในพืช [28] วิตามินบางชนิด เช่น d-biotin ที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์นั้น เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตและการยืดยาวของยอด [29] และสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น L-cysteine, critic acid และ ascorbic acid ที่เติมลงในอาหาร มีผลในการลดหรือยับยั้งชิ้นส่วนไม่ให้มีการขับสารสีน้ำตาล (phenolic compound) ออกจากบาดแผลของชิ้นส่วน ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อเนื้อเยื่อและมีผลไปยับยั้งการเจริญและการพัฒนาของชิ้นส่วนอาจทำให้ชิ้นส่วนตายได้ [8], [26]

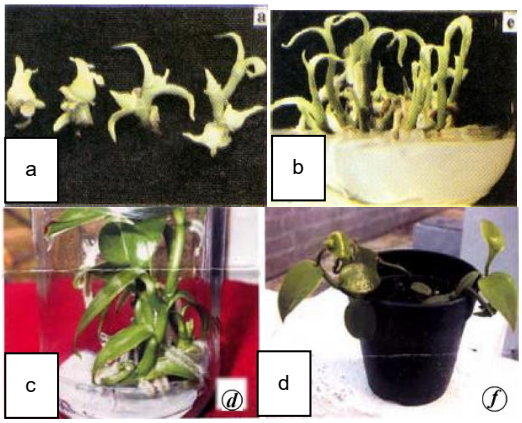
จากรายงานการวิจัยที่ศึกษาวิธีการชักนำและเพิ่มจำนวนยอดจากชิ้นส่วนข้อและปลายยอด วิธีที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนยอดวานิลลา คือ วิธีการของ Giridhar และ Ravishankar (2004) [25] มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนยอดวานิลลาจากชิ้นส่วนข้อ โดยให้ยอดจำนวน 30 ยอดต่อชิ้นส่วนภายในระยะเวลา 75 วัน ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

กล้วยไม้วานิลลาจากชิ้นส่วนตาข้าง วิธีการที่เหมาะสม คือ วิธีการของ George และ Ravisahankar (1997) [24] มีประสิทธิภาพทำให้ได้ยอดจำนวน 42 ยอดต่อตาข้าง ภายในระยะเวลา 134 วัน ยอดที่ได้จากการเพิ่มจำนวนจากชิ้นส่วนปลายยอดและข้อ หรือชิ้นส่วนตาข้าง จะถูกนำไปชักนำให้เกิดรากเพื่อพัฒนาเป็นต้นอ่อนต่อไป หรือถูกตัดแยกออกมาเป็นชิ้นส่วนในการเพิ่มจำนวนเป็นรอบๆ เรียกว่า “subculture” ซึ่งการ subculture แต่ละครั้งสามารถเพิ่มจำนวนต้นเป็นทวีคูณถึง 3 – 10 เท่าตัว และยังมีเทคนิคพิเศษที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยอด โดยการตัดผ่าครึ่งตามความยาวยอดที่เกิดใหม่ แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มจำนวนยอด สามารถเพิ่มจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนได้ 8 – 10 ยอด การ subculture ยอดที่มีการเพิ่มจำนวนเพียง 15 รอบ โดยใช้ระยะเวลา 70 สัปดาห์ สามารถเพิ่มจำนวนต้นวานิลลาได้ถึง 100,000 ต้น [18]

การชักนำยอดให้เกิดราก

ยอดของวานิลลาที่เกิดขึ้นมาใหม่จากการเพิ่มจำนวนทั้งจากชิ้นส่วนปลายยอดและข้อ หรือตาข้าง จะถูกนำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ทำให้มีการพัฒนาเป็นต้นวานิลลาที่มีการสร้างใบและรากได้อย่างสมบูรณ์ โดยสูตรอาหารสังเคราะห์ที่นิยมใช้ คือ อาหารสังเคราะห์สูตร MS และนอกเหนือจากอาหารสังเคราะห์สูตร MS ยังมีการใช้อาหารสังเคราะห์สูตรอื่นๆ เช่น อาหารสังเคราะห์สูตร Knudson [24] หรือ

อาหารสังเคราะห์สูตร Nitsch (N69) [18] ต้นวานิลลาสามารถเกิดรากได้ทั้งในอาหารสังเคราะห์มีการเติมหรือไม่เติม NAA หรือ IBA หรือในอาหารที่เติมสารอื่นๆ เช่น ผงถ่าน [24], [26] หรือน้ำมะพร้าว [2] สามารถชักนำให้ยอดที่ได้จากการเพิ่มจำนวนมีการเกิดรากได้เช่นกัน ยอดจะมีการยืดตัวและเกิดรากได้ภายในระยะเวลา 2 สัปดาห์ ถึง 2 เดือน เกิดรากจำนวน 1 – 3 ราก/ยอด (รูปที่ 2c) [1], [18], [24]



รูปที่ 2. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญ
(a) ยอดวานิลลาที่เกิดใหม่จากการชักนำชิ้นส่วนปลายยอดและข้อ
(b) จำนวนยอดวานิลลาที่เพิ่มขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยง
(c) ยอดวานิลลาจากการเพิ่มจำนวนที่มีการพัฒนาเป็นต้นและเกิดราก
(d) ต้นวานิลลาที่นำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ
ที่มา : Kalimuthu และคณะ (2006) [20] ; Giridhar และ Ravishankar (2004) [25]

การนำต้นอ่อนวานิลลาออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

ต้นวานิลลาที่มีการเกิดรากในสภาพปลอดเชื้อและต้นมีความสมบูรณ์พร้อมที่จะนำออกมาปลูกในสภาพธรรมชาติ จะถูกนำมาปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม (acclimatization) โดยนำต้นวานิลลามาปลูกในวัสดุปลูก เช่น ทรายผสมปุ๋ยหมัก อัตราส่วน 1 : 2 [24], [25] เศษซากใยมะพร้าวที่ย่อยสลายตัวผสมกับปุ๋ยหมักและเพอร์ไลต์ (perlite) อัตราส่วน 1 : 1 : 1 [20] หรือ พีทมอส (peat moss) ผสมกับอะโกรไลต์ (agrolite) อัตราส่วน 1 : 1 [21] นำมาเลี้ยงในสภาพที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 80 – 100 % เป็นเวลา 15 – 30 วัน หลังจากนั้นจึงทำให้ต้นวานิลลามีความแข็งแรง (hardening) โดยการค่อยๆ ลดความชื้นสัมพัทธ์ลงให้ใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติ ใช้ระยะเวลาประมาณ 30 วัน ต้นวานิลลาจะมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 85 – 95 % (รูปที่ 2d) หลังจากนั้นจึงนำต้นไปปลูกในพื้นที่ปลูก [1], [18], [20], [24], [25]

สรุป

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้วานิลลาในสภาพปลอดเชื้อ ควรใช้เมล็ดจากฝักอายุ 6-7 เดือน ก่อนเพาะเมล็ดควรนำเมล็ดล้างไขมันที่เคลือบเมล็ดออกก่อน สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเมล็ด คือ อาหารกึ่งแข็ง MS ที่เติม tryptone 2.0 ก./ล. อาหารกึ่งแข็ง MS ที่เติม tryptone 500 มก./ล. ร่วมกับ NAA 4.0 มก./ล. และ BAP 1.0 มก./ล. และอาหารกึ่งแข็ง MS ที่เติม kinetin 0.5 มก./ล. ทำให้มีการงอกของเมล็ดกล้วยไม้วานิลลาถึง 85% 89% และ 87% ตามลำดับ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเมล็ด คือ 32°ซ และสภาพแสงที่เหมาะสม คือ สภาพมืด

การเพิ่มจำนวนยอดวานิลลาในสภาพปลอดเชื้อจากเพาะเลี้ยงปลายยอด ข้อ และตาข้าง สามารถทำได้โดยการชักนำให้ชิ้นส่วนมีการเกิดยอดใหม่ในอาหารที่เติมสารในกลุ่มไซโตไคนิน เช่น BAP, kinetin, zeatin, และ TDZ หรือสารตั้งต้นของสารกลุ่มไซโตไคนิน เช่น adenine sulfate อาจจะมีการเติมสารกลุ่มออกซิน จิบเบอเรลลิน หรือสารอินทรีย์จากพืช เช่น น้ำมะพร้าวร่วมด้วย เพื่อช่วยในการแบ่งตัวของเซลล์และการยืดยาวของเซลล์ทำให้เกิดยอดใหม่ขึ้นมา สามารถเพิ่มจำนวนยอดใหม่ได้ในอาหารที่เติม BAP อย่างเดียว หรือใช้ร่วมกับสารอื่นๆ เช่น IBA, kinetin, adenine sulfate หรือน้ำมะพร้าว

การเพิ่มจำนวนยอดวานิลลาโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อพืช ทำให้ได้ยอดวานิลลามากถึง 4.17 – 42 ยอดต่อชิ้นส่วน ส่วนการเกิดรากของยอดที่เพิ่มจำนวน สามารถเกิดรากและพัฒนาเป็นต้นวานิลลาได้ง่ายในอาหารที่มีหรือไม่มีการเติมฮอร์โมนประเภทออกซิน

การออกปลูกในสภาพธรรมชาติควรนำต้นอ่อนมาปลูกในวัสดุปลูก และเลี้ยงในสภาพความชื้น 80 – 100% เป็นเวลา 15 – 30 วัน และค่อยๆ ลดความชื้นให้ใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติ ต้นอ่อนมีอัตราการรอดชีวิต 85 – 95 %

เอกสารอ้างอิง

[1] Abebe, Z. and et al. 2009. “Efficient *in vitro* Multiplication Protocol for *Vanilla planifolia* Using Nodal Explants in Ethiopia” . **African Journal of Biotechnology**. 8 (24): 6817 – 6821.

[2] Arditti, J. 2008. **Micropropagation of Orchids Vol. 2.** Oxford: Blackwell Publishing.

[3] Hailemichael, G. and et al. 2012. “The Effect of Different Node Number Cutting on Nursery Performance of Vanilla (*Vanilla planifolia* syn. *Vanilla fragrans*) in South Western Ethiopia”. **International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science.** 2 (9): 408 – 412.

[4] Njoroge, A. M. and et al. 2006. “Propagation of High Quality Planting Materials of Vanilla (*Vanilla planifolia*) Through Tissue Culture.” **In Proceeding of the 10th KARI Biennial Scientific Conference Theme Responding to Demands and Opportunities Through Innovative Agricultural Technologies Knowledge and Approaches.** Kenya Agricultural Research Institute. 12–17 November. KARI Headquarters. Kaptagat Road. Loresho. Nairobi. Kenya.

[5] Divakaran, M., Babu, K. N. and Grisoni, M. 2010. “Biotechnological application in Vanilla”. In **Vanilla**, edited by E. Odoux and M. Grisoni. CRC Press.

[6] Grisoni, M., Pearson, M. and Farreyrol, K. 2010. “Virus diseases of Vanilla”. In **Vanilla**, edited by E. Odoux and M. Grisoni. CRC Press.

[7] Tombe, M. and Liew, C. Y. E. 2010. “Fungal diseases of Vanilla”. In **Vanilla**, edited by E. Odoux and M. Grisoni. CRC Press.

[8] Pierik, R. L. M. 1987. **In Vitro Culture of Higher Plants.** Dordrecht, Netherlands: Martinus Nijhoff.

[9] กาญจนา รุ่งรัชกานนท์. 2555. **กล้วยไม้: เทคโนโลยีและการประยุกต์ใช้งาน.** อุบลราชธานี: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

[10] Knudson, L. 1950. “Germination of Seed of Vanilla”. **American Journal of Botany.** 37: 241 – 247.

[11] Lugo, H. L. 1955. "The Effect of Nitrogen on the Germination of *Vanilla planifolia*". **American Journal of Botany.** 42: 679 – 684.

[12] Divakaran, M. and et al. 1997. "Ovule Culture of Vanilla and It Potential in Crop Improvement". **Biotechnology of Spice Medicinal & Aromatic Plant** : 112 – 118.

[13] Knorr, D. W., Romagnoli, L. G. and Stevens, C. P. 1997. "Rapid Germination of Orchid Seed from Immature Capsules". **United State Patent**: Patent number 5656482

1997. "Rapid Germination of Orchid Seed from Immature Capsules". **United State Patent**: Patent number 5656482

[14] Divakaran, M. and et al. 2006. "Interspecific Hybridization in Vanilla and Molecular Characterization of Hybrids and Selfed Progenies Using RAPD and AFLP Marker". **Scientia Horticulturae**. 108: 414 – 422.

[15] Palama, T. L. and et al. 2010. "Shoot Differentiation from Protocorm Callus Culture of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae): Proteomic and Metabolic Responses at Early Stage". **BMC Plant Biology.** 10 (82): 1 – 18.

[16] Jinyu, D. and Hong, H. 1987. "Aseptic Germination of Vanilla Seed". **Acta Metallurgica Sinica**. 9 (4): 1 – 3.

[17] Menchaca, G. R. A. and et al. 2011. "*In Vitro* Germination of *Vanilla planifolia* and *V. pompona* Hybrids". **Artículo de Invetigacíon**. 13 (1): 80 – 84.

[18] Geetha, S. and Shetty, A. S. 2000. "*In Vitro* Propagation of *Vanilla planifolia*, A Tropical Orchid". **Current Science**. 79 (6): 886 – 889.

[19] Divakaran, M., Babu, K. N. and Peter, K. V. 2006. "Conservation of *Vanilla* Species, *In Vitro*". **Scientia Horticulturae**. 110: 175 – 180.

[20] Kalimuthu, K., Senthilkumar, R. and Murugalatha, N. 2006. "Regeneration and Mass Multiplication of *Vanilla planifolia* Andr. – A Tropical Orchid". **Current Science**. 91 (10): 1401 – 1403.

[21] Lee-Espinosa, H. E. and et al. 2008. "*In Vitro* Clonal Propagation of Vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews')", **Hortscience.** 43 (2): 454 – 458.

[22] Inderiati, S. and Rahman, L. F. 2012. "Efficient Micropropagation of *Vanilla planifolia* Andr. Under Influence of Benzyladenine (BA)". **Journal Agrisistem**. 8 (1): 23 – 26.

[23] ศิริพร ขุนศรี และ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2552. "การขยายพันธุ์ ของวานิลลา (*Vanilla planifolia* Andr.)" จากการเพาะเลี้ยงตาข้างในสภาพปลอดเชื้อ. **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาพืช.** หน้า 630 – 635.

[24] George, P. S., and Ravishankar, G. A. 1997. "*In Vitro* Multiplication of *Vanilla planifolia* Using Axillary Bud Explants". **Plant Cell Reports**.16: 490 – 494.

[25] Giridhar, P. and Ravishankar, G. A. 2004. "Efficient Micropropagation of *Vanilla planifolia* Andr. Under Influence of Thidiazuron, Zeatin and Coconut Milk". **Indian Journal of Biotechnology**. 3: 113 – 118.

[26] ธารทิพย์ เพชระบูรณิน. 2549. “ผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการพัฒนาตาข้างของวานิลลา (*Vanilla planifolia* Andr.)”. **วารสารวิชาการเกษตร.** 24 (1): 97 – 105.

[27] Davies, P. J. 1995. “The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence and Functions”. In **Plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. 2nd edition**, edited by P. J. Davies. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic.

[28] McGaw, B. A. 1995. “Cytokinin Biosynthesis and Metabolism”. In **Plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. 2nd edition**, edited by P. J. Davies. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic.

[29] Abrahamian, P. and Kantharajah, A. 2011. “Effect of Vitamins on *In Vitro* Organogenesis of Plant”. **American Journal of Plant Sciences**. 2: 669 – 674.